Reaktionskinetische Untersuchungen der Lipolyse mit Pankreatin

Verkürzte Fassung der

INAUGURALDISSERTATION

zur

Erlangung der philosophischen Doktorwürde

vorgelegt der

Philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Basel

von

GÉRARD JEAN VORBRODT

aus Zürich (Schweiz)

1962

CITY-DRUCK AG, ZÜRICH

1963

Reaktionskinetische Untersuchungen der Lipolyse mit Pankreatin

Verkürzte Fassung der

INAUGURALDISSERTATION

zur

Erlangung der philosophischen Doktorwürde

vorgelegt der

Philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Basel

von

GÉRARD JEAN VORBRODT

aus Zürich (Schweiz)

CITY-DRUCK AG, ZÜRICH

1963

Genehmigt von der Philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät auf Antrag der Herren Professoren Dr. *P. Speiser* (ETH) und Dr. *K. Meyer*.

Basel, den 6. Februar 1962

Prof. Dr. *M. Eichler*
Dekan

Herrn Gérard Jean *Vorbrodt* wurde von der Philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel am 6. Februar 1962 erlaubt, diesen Teildruck seiner am 6. Februar 1962 genehmigten Inauguraldissertation drucken zu lassen. Die vollinhaltliche Arbeit mit dem Titel: Reaktionskinetische Untersuchungen der Lipolyse mit Pankreatin, kann eingesehen oder entliehen werden:

1. im Pharmazeutischen Institut der Universität Basel;
2. in der Universitätsbibliothek Basel;
3. in der Schweizerischen Landesbibliothek in Bern.

Separatdruck aus Pharmaceutica Acta Helvetiae
Bd. 39 Heft 2 / S. 108–118 Jahr 1964

Separatabdruck aus den «Pharmaceutica Acta Helvetiae» *39*, 108—118 (1964)

Reaktionskinetische Untersuchungen der Lipolyse mit Pankreatin

Einleitung

Bei festen peroralen Arzneiformen mit langanhaltender Wirkung ist die Prüfung und Normierung der Zerfallseigenschaften und der Wirkstoff-Freigabe für die Resorption und Wirkung des Pharmakons von Bedeutung. Die routinemäßige Kontrolle bei der Formulierung, Herstellung und Stabilitätsuntersuchung solcher Arzneiformen ist am ehesten *in vitro* möglich. Voraussetzung ist allerdings das Vorhandensein künstlicher, gastroenteraler Kontrollflüssigkeiten, welche den biologischen Verhältnissen weitgehend entsprechen. Viele feste Arzneiformen mit verzögerter Wirkung enthalten spezifisch magensaftresistente und darmsaftlösliche Trägerstoffe in Form von einhüllenden oder einbettenden Überzügen. Die Eignung solcher Trägerstoffe setzt ein Studium des Spalt- und Auflösungsvermögens durch die Bestandteile des Magen- und Darmsaftes voraus.

Die auffallendsten Unterschiede zwischen Magen- und Darmsaft in bezug auf die Zusammensetzung sind Wasserstoffionen-Konzentration und Fermentverteilung. Das Ausarbeiten von Retard-Arzneiformen mit lediglich pH-abhängigen Trägerstoffen ohne Berücksichtigung der Fermentaktivität liegt zurzeit im Bereich der praktischen industriellen Möglichkeiten. Da aber das pH im Magen und den vorderen Darmabschnitten des kranken und gesunden Organismus starken individuellen Schwankungen unterworfen ist, scheint die Zuverlässigkeit solcher Retard-Formen in Frage gestellt. Es ist deshalb von Interesse, abzuklären, ob bei der Arzneiformung nicht auch Trägerstoffe Verwendung finden können, welche fermentativ angreifbar sind. Eine verzögerte Freigabe des Wirkstoffes ist vor allem im Duodenum wünschenswert, was durch den Abbau der Trägerstoffe seitens Enzymen der Bauchspeicheldrüse möglich wäre. Die Bauchspeicheldrüse, der Hauptlieferant der Intestinalfermente, ist maßgeblich am Kohlehydrat-, Eiweiß- und Fettabbau beteiligt. Da aber protein- und kohlehydratabbauende Fermente bereits schon im Mund und Gastrum

vorhanden sind, welche die Trägerstoffe frühzeitig abbauen, kommen vor allem Glyceride, welche auf Lipasen ansprechen, als Trägerstoffe für verzögerte Wirkstoffabgabe in Frage, da Esterasen zur Hauptsache erst im Darm auftreten.

Bevor die verzögerte Wirkstoff-Freigabe aus Arzneiformen mit Glyceriden als Trägerstoffe untersucht werden kann, muß ein künstlicher Duodenalsaft mit bekannten optimalen Lipaseeigenschaften formuliert werden. Für eine solche Formulierung muß eine sichere, gut reproduzierbare Methode zur Bestimmung der Lipaseaktivität bekannt sein. In der vorliegenden Arbeit wird das Verhalten von Pankreaslipase auf Arachisfett unter möglichst physiologischen, gastroenteralen Bedingungen *in vitro* untersucht.

Theoretischer Teil

Aktivitätsbestimmung der Pankreaslipase

Zur Bestimmung der lipolytischen Wirksamkeit der Pankreaslipase sind manometrische[2], nephelometrische[3], stalagmometrische[4-7] sowie dilatometrische Bestimmungsmethoden bekannt; sie werden namentlich auf serologischem Gebiete angewandt. Alkalimetrische Bestimmungsmethoden sind weit verbreitet[8-12] und auch in einigen Arzneibüchern offizinell. Vergleichende Untersuchungen der verschiedenen Methoden haben ergeben, daß die bisherigen Methoden zur Aktivitätsbestimmung der Lipase im Pankreatin für unsere Zwecke nicht geeignet sind, so daß eine neue Prüfungsmethode zur Aktivitätsbestimmung entwickelt werden mußte. Für die Aktivitätsbestimmung der Pankreaslipase können sowohl natürliche als auch synthetische Glyceride verwendet werden. Natürliche Fette und Öle scheinen den Vorzug zu haben[13-22], weshalb gehärtetes Erdnußöl (Oleum Arachidis hydrogenatum Ph. Helv. V) als Modellsubstanz verwendet wird.

[2] *Rona P.* und *Lasnitzky A.*, Biochem. Z. *152*, 504 (1924).
[3] *Rona P.* und *Kleinmann H.*, Biochem. Z. *174*, 18 (1926).
[4] *Rona P.* und *Michaelis S.*, Biochem. Z. *31*, 345 (1911).
[5] *Willstätter R., Memmen F.* und *Haurowitz F.*, Z. physiol. Chem. *129*, 1 (1923); *138*, 216 (1924).
[6] *Willstätter R., Memmen F.* und *Haurowitz F.*, Z. physiol. Chem. *140*, 203 (1924).
[7] *Zorn B.*, Fermentforsch. *15*, 397 (1938).
[8] *Willstätter R., Memmen F.* und *Waldschmidt-Leitz E.*, Z. physiol. Chem. *125*, 93 (1923).
[9] *Willstätter R.* und *Memmen F.*, Z. physiol. Chem. *133*, 229 (1924).
[10] *Balls A.K., Mattlock M.B.* und *Tucker J.W.*, J. biol. Chem. *122*, 125 (1937).
[11] *Archibald R.M.* und *Oritz P.*, J. biol. Chem. *165*, 443 (1946).
[12] *Steudel H.*, Biochem. Z. *318*, 205 (1948).
[13] *Schoenheyder F.* und *Volqvartz K.*, Acta physiol. scand. *9*, 62 (1945).
[14] *Desnuelle P., Naudet M.* und *Rouzier J.*, Biochim. biophys. Acta *2*, 561 (1948).
[15] *Yamamoto T.*, J. Biochem. [Tokyo] *38*, 147 (1951).
[16] *Yamamoto T.*, J. Biochem. [Tokyo] *38*, 277 (1951).
[17] *Borgström B.*, Acta physiol. scand. *30*, 231 (1954).
[18] *Borgström B.*, Biochim. biophys. Acta *13*, 149 (1954).
[19] *Clément G.* und *Clément J.*, Bull. Soc. Chim. biol. *36*, 1319 (1954).
[20] *Mattson F.H.* und *Beck L.W.*, J. biol. Chem. *214*, 115 (1955).
[21] *Bunch L.D.* und *Emerson R.*, Clin. Chem. *2*, 75 (1956).
[22] *Desnuelle P.* und *Savary P.*, Biochim. biophys. Acta *21*, 349 (1956).

Dispersität

Die dem Enzym dargebotene Oberflächenbeschaffenheit des Substrates übt einen offensichtlichen Einfluß auf das Spaltvermögen des Enzyms aus; eine Tatsache, die unseres Wissens bisher nicht konsequent berücksichtigt wurde. Läßt man Lipase auf ein Glycerid einwirken, ohne dessen Oberfläche zu vergrößern, so ist die hydrolytische Wirkung des Fermentes gering. Durch Überführen des Glycerides in eine grobdisperse Pseudo-Emulsion mittels Schütteln kann zwar die Fermentaktivität etwas verbessert werden, doch werden quantitativ-optimale und reproduzierbare Resultate nur dann erhalten, wenn das zu hydrolysierende Fett oder Öl in feinst disperser Form vorliegt. Als optimaler Dispersitätsgrad wären Tröpfchengrößen von etwa 1μ wünschenswert, da im Organismus Tröpfchen dieser Größenordnung durch Gemische von Tri- und Diglyceriden in der inneren Phase sowie einem Emulgatorenkomplex aus Gallensäuresalzen, Seifen und Monoglyceriden in der äußeren Phase zu Stande kommen. Die für unsere *in vitro*-Versuche zur Verfügung stehenden Emulgatoren reduzieren in allen geprüften Zusammensetzungen das zu verdauende Glycerid höchstens auf eine durchschnittliche Tröpfchengröße von 5–10 μ.

Bei der Emulgierung der Fette im Darm spielen Gallensäuren eine wichtige Rolle. Ihre Salze sind wasserlöslich, weisen grenzflächenaktive Eigenschaften auf, und ihre emulgierenden und lösungsvermittelnden Eigenschaften beruhen auf Micellbildung, die je nach Konzentration sich verschieden auswirkt, was vor allem an Natriumtaurocholatlösungen ersichtlich ist[23]. Ob Gallensäure-Salze allein oder unter Mithilfe von Seifen ihre emulgierenden und lösungsvermittelnden Eigenschaften ausüben, steht noch nicht mit Sicherheit fest[24]. Gallensäure-Salze erfüllen die an echte Emulgatoren gestellten Anforderungen vortrefflich, außer daß solche Emulsionen sich gegen Elektrolyte und kationenaktive Stoffe als instabil erweisen. Lecithin sowie das lecithinähnliche Phospholipid Astec® 4135* erweisen sich gegenüber Elektrolyten als weitgehend indifferent. Diese besitzen zudem gute Eigenschaften zur Überführung des Glycerides in eine feinverteilte disperse Form, weshalb für unsere *in vitro*-Versuche vorwiegend das letztere Phosphatid verwendet wurde.

Wasserstoffionen-Konzentration

Da die Fermentaktivität von der H^+-Konzentration abhängig ist und die lipolytische Spaltung von Glyceriden zwangsläufig mit der Bildung von sauren Produkten einhergeht, muß dem pH während der Esterhydrolyse besondere Beachtung geschenkt werden. Wird die Lipase bei einem für dessen Aktivität anfänglich günstigen pH auf ein Substrat einwirken gelassen, so verursachen die Spaltprodukte schnell eine Zunahme der Wasserstoffionen-Konzentration. Je mehr saure Hydrolyseprodukte entstehen, desto mehr entfernt sich die Wasserstoffionen-Konzentration vom optimalen Aktivitätsbereich.

* Associated Concentrates, Division American Lecithin Co. Inc., Woodside 77, N. Y., USA.

[23] *Kwall P. E.*, Pharm. Zhalle *94*, 290 (1955).

[24] *Leuthardt F.*, Lehrbuch der physiologischen Chemie, W. de Gruyter & Co., Berlin, 11. Aufl., 1952, S. 224; 12. Aufl., 1955, S. 471.

Eine optische pH-Kontrolle durch Zusatz von Farbindikatoren während der Reaktion erwies sich als undurchführbar. Auch das Aufrechterhalten des optimalen pH-Bereiches durch präliminäre Zugabe von Puffergemischen hat sich nicht bewährt, so daß ständige pH-Überwachung und laufende Eliminierung der fortwährend entstehenden sauren Spaltprodukte unerläßlich ist. Der optimale Wirkungsbereich für Pankreaslipase liegt zwischen pH 7 und 9. Zur Aktivitätsbestimmung des Pankreasfermentes werden deshalb viele in diesem pH-Bereich arbeitenden Puffergemische verwendet[7,13,14,16,18,19,21,22,25-27]. Einige Autoren haben zwar festgestellt, daß trotz Pufferzugabe die Wasserstoffionen-Konzentration gegen Ende der Reaktion nicht mehr im optimalen pH-Bereich liegt[14,28], doch wird keine entsprechende Methodik zur Aufrechterhaltung des pH angegeben. Für Lipase im optimalen pH-Wirkungsbereich sind folgende Puffergemische möglich[29]:

Barbital-Natrium Puffer nach *Michaelis*
Barbital-Natriumacetat Puffer nach *Michaelis*
Borax-Phosphat Puffer nach *Kolthoff*
Citrat-Borat-Phosphat Puffer nach *Teorell* und *Stenhagen*
Citronensäure-Phosphat Puffer nach *McIlvaine*
Phosphat Puffer nach *Soerensen*
Piperazin-Glycylglycin Puffer nach *Smith* und *Smith*
Tris Puffer und Trismaleat Puffer nach *Gomori*

Die Forderung eines atoxischen, physiologischen Puffergemisches schließt die Verwendung einer Großzahl dieser Systeme aus, so daß für gastroenterale *in vitro*-Untersuchungen lediglich Gemische nach *Soerensen*, *McIlvaine*, *Smith* und *Smith* und *Gomori* in Frage kommen.

Um die Nachteile einer präliminären Pufferung zu vermeiden und dennoch die bei der Hydrolyse entstehenden sauren Spaltprodukte zu eliminieren, wird in unseren Versuchen das Reaktionsgemisch ständig potentiometrisch überwacht und eine pH-Korrektur durch vollautomatische Zugabe von Lauge vorgenommen.

Hydrolysezeit

Die in der Literatur beschriebenen Einwirkungszeiten des Enzyms auf sein Substrat sind je nach gestelltem Arbeitsziel unterschiedlich lang[20,26,27]. Sollen in einer Versuchsserie die Bedingungen und Zusätze zur Förderung der lipolytischen Wirksamkeit vergleichenderweise untersucht werden, so sind immer dieselben Reaktionszeiten zu wählen, in der Annahme, daß ein Fermentmaterial unter gleichen Versuchsbedingungen in gleichen Zeitabschnitten eine gleiche hydrolytische Wirksamkeit ausübt. Bei unseren Versuchen hat sich eine gleichbleibende relative kurze Einwirkungszeit von 60 min als günstig erwiesen.

[25] *Ramakrishnan C. V.* und *Nevgi G. V.*, J. indian chem. Soc. *27*, 337 (1950).
[26] *Borgström B.*, Biochim. biophys. Acta *13*, 491 (1954).
[27] *Goldman M. L.*, *Burton T. H.* und *Rayman M. M.*, Food Res. *19*, 503 (1954).
[28] *Borgström B.*, Acta physiol. scand. *25*, 326 (1952).
[29] Documenta Geigy, Wissenschaftliche Tabellen, 6. Aufl., 1960, S. 277.

Hydrolysetemperatur

Die optimale Temperatur für die Lipaseaktivität[7,13,14,16,19-22,27,30,31] liegt zwischen 30° und 40°. Bei Untersuchungen mit fermentativ angreifbaren Trägerstoffen und Aktivatoren scheint es angezeigt, die Reaktionstemperatur der in den Duodenalabschnitten vorherrschenden Temperatur von 38° anzupassen.

Pankreatin

Pankreatin, ein weißes bis bräunlichgelbes Pulver oder Blättchen von schwachem, eigenartigem, nicht fauligem Geruch ist in Wasser langsam und nur unvollständig löslich[32]. In trockenem Zustand behält Pankreatin seine Lipaseaktivität für lange Zeit, besonders wenn im Exsikkator bei +4° aufbewahrt[27]. In wäßriger Suspension verliert das Ferment bei Zimmertemperatur seine Wirksamkeit schnell. Bei +4°, wie bei Zusatz von NaCl ist die Suspension etwas stabiler. Wäßrige Suspensionen müssen unmittelbar nach der Herstellung verwendet werden[27]. Meist wird das Ferment in wäßriger Lösung suspendiert dem Reaktionsgemisch beigefügt[14,19,27,30]. Pankreatin ist bis auf kleine Mengen glycerinlöslich[33]. Wird eine Suspension von 1,0 g Pankreatin in 200 ml 70-proz. Glycerin vom unlöslichen Teil durch Zentrifugieren getrennt, so behält die Lösung bei +4° aufbewahrt ihre Aktivität über gewisse Zeit und wird oft als Lipasestammlösung verwendet[13,16]. Da die Haltbarkeit der wäßrigen oder glycerinhaltigen Suspensionen über längere Zeit fragwürdig ist und zudem die mangelhafte Dosierungsgenauigkeit flüssiger Suspensionen Anlaß zu Streuungen bei unseren Untersuchungen gibt, wird das genau gewogene Ferment in Pulverform dem Reaktionsgemisch beigefügt.

Lipolyse-Bestimmungsmethoden

Ältere Methoden zur Bestimmung der Fettsäuren aus der Fetthydrolyse mit Pankreatin, wie die α-Naphtholphtalein Methode[34], die Bestimmung der wasserlöslichen Fettsäuren[33] oder Extraktion[35] sind heute durch die schnelleren, exakteren und bequemeren Adsorptionsmethoden der Säulenchromatographie an Amberlite und Silicagel vollständig verdrängt worden. Auf solche Weise können die entstehenden Fettsäuren, Mono- und Diglyceride sowie die verbleibenden Triglyceride isoliert werden[17,20,26,36,37].

Die bei der Hydrolyse entstehenden sauren Produkte können auch gesamthaft erfaßt werden und die Menge an Spaltprodukten durch den Laugeverbrauch als Äquivalent einer bestimmten Fettsäure ausgedrückt werden. Hierzu benötigt man Blindversuche, so daß der Mehrverbrauch an Lauge gegenüber dem Blindversuch

[30] *Minard F.N.*, J. biol. Chem. *200*, 657 (1953).
[31] *Desnuelle P.* und *Constantin J.*, Bull. Soc. Chim. biol. *37*, 6 (1955).
[32] Pharmacopoea Helvetica, Editio quinta, 1949, S. 768.
[33] *Hillig F.*, J. Ass. agric. Chem. *36*, 1077 (1953).
[34] *Armstrong T.V.* und *Harper W.J.*, J. Dairy Sci. *35*, 59 (1962).
[35] *Davis B.D.*, Arch. Biochem. *15*, 351 (1947).
[36] *Harper W.J.* und *Armstrong T.V.*, J. Dairy Sci. *37*, 481 (1954).
[37] *Harper W.J.*, *Schwartz D.P.* und *El-Hagarawy J.S.*, J. Dairy Sci. *39*, 46 (1956).

zum Maßstab der Hydrolyse genommen werden kann. Stellt man der enzymatischen Hydrolyse eine totale Verseifung am Rückflußkühler gegenüber und betrachtet man diese Verseifung als 100%, so kann die enzymatische Fettspaltung im prozentualen Verhältnis dazu ausgedrückt werden.

Experimenteller Teil

Emulsionen und Reaktionsbedingungen. Für unsere Versuche verwenden wir zur Bereitung des Reaktionsgemisches eine O/W-Stockemulsion, enthaltend 20 Gew.-% gehärtetes Erdnuß-Fett. Stockemulsionen mit folgenden Emulgatoren wurden untersucht:

Lipase-Emulsion 5%
Stockemulsion mit 5% hitze-inaktivierter Lipase (30 min / 98°)
Lecithin-Emulsion 1%. Lecithin wird in Äther gelöst, mit Öl gemischt, der Äther durch Abdampfen entfernt und das Lecithin-Ölgemisch mit Wasser emulgiert.
Astec-Emulsion 1%. Astec® 4135 bildet schon in Konzentrationen von weniger als 0,1% stabile Emulsionen, wird aber im Hinblick auf später verwendete Zusatzstoffe (Elektrolyte) in einer Konzentration von 1% verwendet.
Na-Taurocholat-Emulsionen 0,5%, 0,25%, 0,1%, 0,05%. Obwohl Gallensäure-Salze schon in Konzentrationen von 0,1% gute Emulsionsbildner sind, wird im Hinblick auf inkompatible Zusätze von Elektrolyten und kationenaktiven Stoffen in Konzentrationen von 0,4% gearbeitet.
Astec-Emulsion mit Puffer. Vergleichsweise wird den obigen Emulsionen ohne Puffer eine 1-proz. Astec® 4135-Emulsion mit 5,00 ml eines 0,5M Phosphatpuffers gegenübergestellt.

Für jeden Hydrolysenversuch werden die Emulsionen frisch hergestellt. Zur Tröpfchenverkleinerung und Stabilisierung werden Kolbenhomogenisatoren verwendet, da diese die beste Dispersität ergaben. Nach dreimaliger Passage der Stockemulsionen mit verschiedenen Emulgatoren, resultiert bei vielen Emulsionen eine gute Tröpfchengrößenverteilung gemäß Tab. 1 und 2. Da die potentiometrische pH-Kontrolle eine bestimmte minimale Flüssigkeitsmenge verlangt, wurden je 10,0 g Stockemulsion mit 25,0 g destilliertem Wasser verdünnt. Die lipolytisch wirkungsverändernden Zusatzstoffe werden in der wäßrigen Phase der Stockemulsion und die Puffersalze in der zur Verdünnung der Stockemulsion erforderlichen Wassermenge gelöst. Durch die Verdünnung ist keine signifikante Beeinflussung der Teilchengrößenverteilung wahrnehmbar.

Die Bestimmung der lipolytischen Wirksamkeit wird mit 50 mg Pankreaslipase * (genau gewogen) pro 35,0 g verdünnter Stockemulsion durchgeführt. Nach Einstellen auf gewünschtes pH und Temperatur wird das Fermentpulver beigefügt, durch magnetische Rührwerke zur dauernden Bewegung des Hydrolysegemisches sofort homogen suspendiert und eine Stunde lang auf das Substrat einwirken gelassen. Die Temperaturregulierung des Reaktionsgemisches erfolgt mittels eines durch Umwälzung thermostatierten Wasserbades. Die Temperaturmessung erfolgt im Reaktionsgemisch bei 38° mit Präzisionsthermometern einer Ablesegenauigkeit von ± 0,05°.

Die pH-Messung erfolgt über eine kombinierte Glaselektrode Typ Metrohm EA 120 X und das in einem Titrierautomaten Typ Metrohm E 326 eingebaute pH-Meter **.

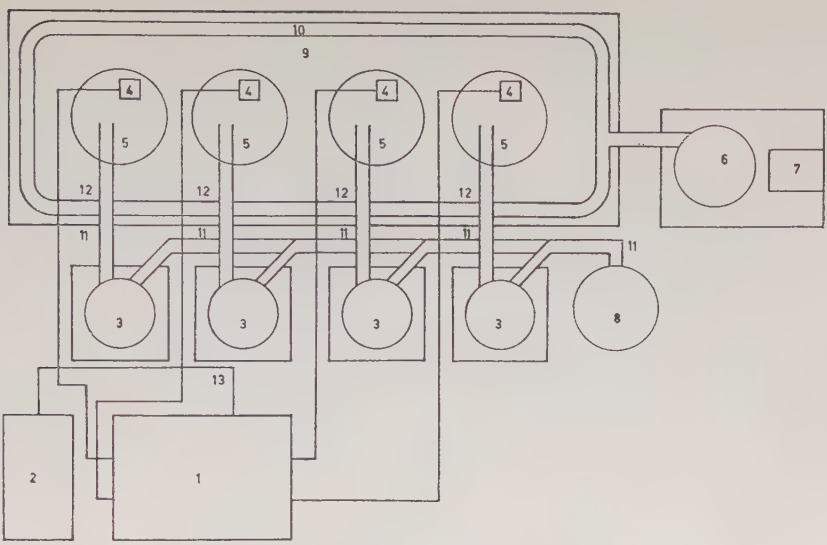
Titration. Für den Laugezusatz und zum Ablesen der benötigten Laugemenge werden motorgetriebene Kolbenbüretten im Titrierstand Metrohm E 334–20 verwendet. Als Titrationsmittel dient wäßrige 0,1N Natronlauge, bei Versuchen mit großer Hydrolyse 0,25N Natronlauge, hergestellt aus Titrisol-Ampullen «Merck». Die pH-Regulierung während der Reaktion erfolgt automatisch durch einen entsprechend modifizierten Titrierautomaten Typ E 326. Eine besondere Versuchsanordnung gestattet es, vier Parallelversuche gleichzeitig laufen zu lassen (Abb. 1). Eine Schaltuhr besorgt die automatische Umschaltung von einer Meßstelle zur nächsten, wobei die Meßzeiten pro Meßstelle beliebig verstellbar sind. Während der Hydrolyse wird das pH während einer Stunde durch Zugabe entsprechender Laugemengen laufend auf dem gewünschten Wert gehalten. Nach einstündiger Reaktionszeit wird das Reaktionsgemisch auf pH 10,0 titriert. Die während der Reaktion und zur Titration auf pH 10,0 verwendeten Laugemengen werden addiert und durch den Blindwert desselben Reaktionsgemisches ohne Pankreatin korrigiert.

Das Mittel aus vier parallelen Aktivitätsbestimmungen am gleichen Reaktionsgemisch und unter gleichen Einwirkungsbedingungen ergibt Resultate von genügender Genauigkeit, worüber später berichtet wird.

* Wir danken der Schweizerischen Ferment AG, Basel, für dieses Material.
** Metrohm AG, Herisau, Schweiz.

Abbildung 1

Schematischer Aufbau der Apparatur zur Messung der lipolytischen Aktivität des Pankreatins



1 Titrierautomat (Metrohm E 326)
2 Schaltuhr
3 Motorgetriebene Kolbenbüretten (Metrohm E 334–20)
4 Glaselektroden (Metrohm EA 120 X)
5 Reaktionsgefäße mit magnetischen Rührwerken
6 Umwälzpumpe
7 Thermostat mit Heizkörper
8 Vorratsgefäß für Lauge
9 Plexiglaswanne
10 Warmwasserleitungsrohr
11 Laugeleitungen
12 Elektrodenkabel
13 Kabel für Meßstellenumschaltung

Hydrolysen verschiedener Emulsionen. Die Wirksamkeit von 50 mg Lipase wird bei den beschriebenen Emulsionen ohne Puffer in Abhängigkeit vom pH geprüft. Vergleichsweise wird diesen Emulsionen eine 1-proz. Astec-Emulsion gegenübergestellt, wobei dem Reaktionsgemisch 5,00 ml eines 0,5M Phosphatpuffers beigefügt werden. Die Abhängigkeit der lipolytischen Wirksamkeit vom pH in einem pH-Bereich von 6,5–9,5 mit Meßintervallen von 0,5 pH-Einheiten ist in Tab. 3 und Abb. 2 dargestellt.

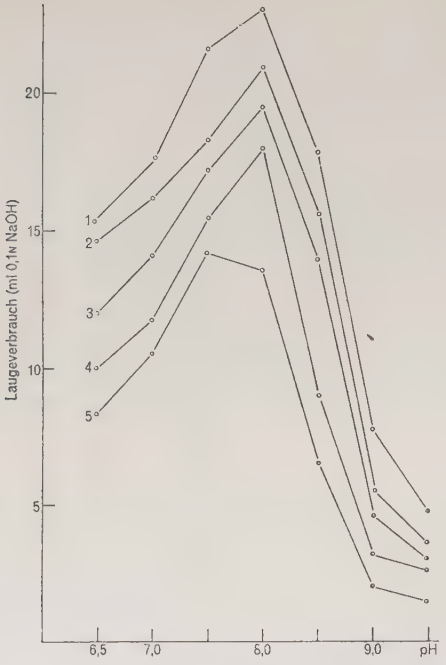
Diskussion und Folgerung

Aktivitätsbestimmung

Von den in der Literatur aufgeführten Prüfungsmethoden zur Aktivitätsbestimmung der im Pankreatin enthaltenen Lipase wählten wir die alkalimetrische Bestimmungsmethode. Der Forderung, daß bei den *in vitro*-Versuchen Reaktionsbedingungen vorherrschen müssen, die den *in vivo*-Bedingungen weitgehend entsprechen, wurde in physikalisch-chemischer wie in physiologischer Hinsicht nach Möglichkeit entsprochen.

Abbildung 2

Hydrolyseaktivität verschiedener Fettemulsionen in Abhängigkeit vom pH



1 Astec®-Puffer-Emulsion
2 Gallensalz-Emulsion
3 Astec®-Emulsion
4 Lecithin-Emulsion
5 Lipase-Emulsion

Substrat, Emulgator, pH, Puffer

Bei der Wahl des Substrates wurde an die Möglichkeit einer Einhüllung oder Einbettung von Wirkstoffteilchen in ein festes Triglycerid gedacht, wodurch vorgängig der Wirkstofffreigabe die umhüllende Schutzschicht durch die Bestandteile des Darmsaftes hydrolysiert werden müssen.

Zur Emulgierung der Fette bedient sich der Organismus hauptsächlich der Gallensäuren. Die gallensauren Salze erfüllen aber nicht alle an Emulgatoren zu stellenden technologischen Anforderungen. Auch die Verwendung grenzflächenaktiver Synthetica oder viskositätserhöhender Makromoleküle zur Dispergierung des Fettes entspricht unseres Erachtens weniger den physiologischen Gegebenheiten als die Verwendung von Phospholipiden wie Lecithin oder Astec®. Letzteres bildet Emulsionen von hohem Dispersitätsgrad, welche gegenüber pH-Veränderungen und Elektrolytzusätzen wenig empfindlich sind. Das wichtigste enterale Puffersystem ist ein Bicarbonat-Kohlensäuregemisch in Verbindung mit Proteinen[24]. In der Fachliteratur

findet sich aber lediglich ein Carbonat-Bicarbonat-Puffer nach *Delory* und *King*[29] für den pH-Bereich 9,2–10,6. Ein vielfach verwendeter Ammoniakpuffer[7,14,16,18,22] ist praktisch ebenfalls wertlos. Alle diese Systeme sind chemisch instabil, da jede anorganische Kohlensäuresalzlösung besonders bei erhöhten Temperaturen Kohlendioxyd abgibt und jede Lösung eines anorganischen Ammoniumsalzes Ammoniak freisetzt, so daß als stabile enterale Puffer für *in vitro*-Versuche am ehesten Phosphatpuffersysteme in Frage kommen dürften.

Homogenisierung und Hydrolyse verschiedener Emulsionen

Je feiner die disperse Phase einer Emulsion verteilt ist, desto größer wird deren Oberfläche. Der Dispersitätsgrad, das Verhältnis der Oberfläche zum Volumen, läßt sich nur durch zuverlässige mikroskopische Teilchengrößenanalysen ermitteln, welche in Analogie zu einer früher beschriebenen Methode erfolgte[38]. Aus Tab. 1 ist ersichtlich, wieviel Prozent des Gesamtvolumens der inneren Phase aus Fetttröpfchen besteht, deren mittlerer Durchmesser einer bestimmten Teilchenklasse entspricht. Aus der Summenhäufigkeitsverteilung (Tab. 2) kann zudem abgelesen werden, wieviel Prozent des Gesamtvolumens aus Tröpfchen besteht, deren mittlerer Durchmesser kleiner als eine festgelegte Größe ist.

Tabelle 1

Häufigkeitsverteilung

Teilchengrößenverteilung der Fetttröpfchen von Erdnußfett-Emulsionen in Prozent des Gesamtvolumens

Emulsion	Vol.-%-Anteil pro Teilchengrößenklasse							
	Mittlerer Durchmesser der Teilchengrößenklassen [μ]							
	0,5	1,0	2,0	3,25	5,0	7,0	9,0	11,0
Astec® 1%	17,0	21,5	42,5	19,0				
Na-Taurocholat 0,5%	6,0	7,5	10,0	15,0	40,0	12,5	9,0	
Na-Taurocholat 0,25%	5,0	7,0	10,0	17,0	37,0	14,0	10,0	
Na-Taurocholat 0,1%	7,5	10,5	13,0	21,0	32,0	8,0	6,0	2,0
Na-Taurocholat 0,05%	3,0	4,0	6,5	13,0	22,0	27,0	18,5	6,0
Lecithin 1%		8,25	28,0	41,5	13,00	9,25		

Der Phospholipid-Emulgator Astec® 4135 bildet Emulsionen von guter Dispersität, welche den Größenverhältnissen im Magen-Darm-Kanal einigermaßen nahekommt.

Ein Vergleich der pH-Aktivität bei der Hydrolyse verschiedener Emulsionen (Tab. 3, Abb. 2) mit den entsprechenden Tröpfchengrößen der Emulsionen (Tab. 1) ergibt, daß gleiche Mengen Pankreaslipase (50 mg) Emulsionen von niedrigerem Dispersitätsgrad in geringerem Maße zu hydrolysieren vermögen.

[38] *Tawashi R.* und *Speiser P.*, Pharm. Acta Helv. *36*, 397 (1961).

Tabelle 2

Summenhäufigkeitsverteilung

Teilchengröße verschiedener Erdnußfett-Emulsionen

Emulsion	Summenhäufigkeits %-Anteil pro Teilchengrößenklasse							
	Mittlerer Durchmesser der Teilchenklassen [μ]							
	0,5	1,0	2,0	3,25	5,0	7,0	9,0	11,0
Astec® 1%	17,0	38,5	81,0	100,0				
Na-Taurocholat 0,5%	6,0	13,5	23,5	38,5	78,5	91,0	100,0	
Na-Taurocholat 0,25%	7,0	12,0	22,0	39,0	76,0	90,0	100,0	
Na-Taurocholat 0,1%	7,5	18,0	31,0	52,0	84,0	92,0	98,0	100,0
Na-Taurocholat 0,05%	3,0	7,0	13,5	26,5	48,5	75,5	94,0	100,0
Lecithin 1%		8,25	36,25	77,75	90,75	100,0		

Tabelle 3

Lipolytische Wirksamkeit in Abhängigkeit vom pH verschiedener Emulsionen

Hydrolyse in ml verbrauchter 0,1N NaOH

Emulsion	Verbrauch an 0,1N NaOH							
pH	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0	9,5
Lipase 5%	8,3	10,5	*14,2*	13,6	6,5	2,0	1,5
Lecithin 1%	10,0	11,8	15,5	*18,0*	9,0	3,2	2,6
Astec® 1%	12,0	14,1	17,2	*19,5*	13,9	4,6	3,0
Na-Taurocholat 0,4%	14,6	16,2	18,3	*20,9*	15,6	5,5	3,5
Astec®-Puffer	15,5	17,5	21,6	*23,0*	17,8	7,7	4,8

Die Aktivitätskurven (Abb. 2) der verschiedenen Emulsionen über den pH-Bereich 6,5–9,5 zeigen einen ungefähren parallelen Verlauf. Verschiedentlich konnte auch beobachtet werden, daß mit zunehmender Dispersität das Hydrolyse-Optimum von pH 7 gegen 8 verschoben wird.

Zusammenfassung

Zur Bestimmung der lipolytischen Wirksamkeit des Pankreatins gegenüber O/W-Emulsionen mit Oleum Arachidis hydrogenatum Ph. Helv. V. als disperse Phase wird eine alkalimetrische *in vitro*-Bestimmungsmethode ausgearbeitet. Die Hydrolysebedingungen entsprechen weitgehend den im gastroenteralen System herrschenden Verhältnissen.

Mikroskopische Teilchengrößenverteilungs-Analysen ergeben, daß der Phospholipid-Emulgator Astec® 4135 Emulsionen von guter reproduzierbarer Dispersität zu bilden vermag.

Pankreas-Lipase vermag Öl von Emulsionen mit höherem Dispersitätsgrad in vermehrtem Maße zu hydrolysieren. Mit zunehmender Dispersität und Oberfläche der dispersen Phase wird nicht nur die Hydrolyse positiv beeinflußt, sondern auch das optimale Hydrolyse-pH scheint vom pH 7 gegen pH 8 verschoben.

Résumé

Nous avons élaboré une méthode alcalimétrique pour la détermination de l'activité lipolytique de la pancréatine envers des émulsions à l'huile d'arachide hydrogénée. Les conditions d'hydrolyse *in vitro* correspondent plus ou moins à celles du système gastroentéral.

Des analyses microscopiques de la répartition de la taille des particules montrent que l'émulsifiant phospholipidique Astec® 4135 donne des émulsions d'une bonne et reproductible dispersité.

La lipase pancréatique est capable d'hydrolyser davantage l'huile d'émulsions d'un degré de dispersité élevé. L'accroissement de la dispersion et de la surface de la phase huileuse intérieure ne provoque pas seulement une augmentation de l'hydrolyse, mais semble également déplacer le pH optimal d'hydrolyse de pH 7 vers pH 8.

Summary

An alcalimetric method of evaluating the lipolytic activity of pancreatin in O/W-emulsions with hydrogenated peanut oil has been developed. The *in vitro* hydrolysis conditions confirm almost to the physiological state of the gastroenteral system.

Microscopic analyses of particle size distribution show that the phospholipid Astec® 4135 gives emulsions of good and reproducible dispersity.

Pancreatic lipase hydrolyses the emulsion oil droplets of finer dispersity to a higher degree. Increase of the dispersion rate and of the surface of the interior oily phase causes not only an increase of hydrolysation, but seems also to shift the optimal hydrolysis pH from pH 7 to 8.

Curriculum vitae

Am 25. Dezember 1931 wurde ich, Gérard J. Vorbrodt, als Sohn des Jean-Charles Vorbrodt, Ing.-Chem., von Zürich und der Alice, geborene Dagon, in Paree auf der Insel Java im damaligen Niederländisch-Indien geboren.

Nach der Rückkehr meiner Eltern in die Schweiz begann meine Schulbildung in der Primarschule Pratteln. Nach fünf Primarschuljahren besuchte ich während drei Jahren das Realgymnasium in Basel. Nach ordnungsgemäßem Verlassen dieses Gymnasiums setzte ich meine Gymnasialbildung am mathematisch-naturwissenschaftlichen Gymnasium in Basel fort, wo ich im Frühjahr 1952 die Reifeprüfung bestand.

Anschließend begann ich an der Universität Basel das Pharmaziestudium. Das obligatorische Assistentenjahr absolvierte ich in der Pharmacie Tissot in Colombier (Neuchâtel).

Nach Abschluß des Fachstudiums und bestandenem Staatsexamen im Frühjahr 1959 begann ich unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. *Peter P. Speiser* und Herrn Prof. Dr. *Kuno Meyer* die vorliegende Dissertation, die ich im Herbst 1961 abschloß.

Während meines Studiums besuchte ich die Vorlesungen und Praktika folgender Herren Professoren und Dozenten:

H. Baur, K. Bucher, H. Dahn, H. Erlenmeyer, M. Geiger-Huber, C. Grob, P. Huber, E. Iselin, H. Lehmann, K. Leupin, K. Meyer, T. Reichstein, E. Rothlin, Ch. Tamm, J. Tomcsik, I. Tschudi-Steiner, W. Vischer, R. Wizinger.